

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19570223

研究課題名（和文）有顎脊椎動物生体防御の要、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子の分子進化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular evolution of the major histocompatibility complex (MHC) molecule, critical for the defense system of the jawed vertebrates

研究代表者

橋本 敬一郎（HASHIMOTO KEIICHIRO）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：70192268

研究成果の概要（和文）：

MHC分子群の全体像を明らかにし、MHC分子の分子進化を解明することを目的とする。研究がまだ非常に不十分であり、しかもMHC分子研究上動物系統発生的に鍵となる位置を占める魚類において、MHC分子群の解析を行った。軟骨魚類及び硬骨魚類ゲノム等からの単離解析を行い、また利用可能なデータベースを用いた解析を行った。新規遺伝子の配列を明らかにし、発現解析、遺伝子構造解析を実施した。また、分子内ドメインがMHC分子に関連していることが判明した分子について論文発表を行い、新規MHC関連分子については現在論文を準備中である。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the evolution of MHC molecules in the vertebrates, we tried to isolate novel MHC-related genes from various fish genome. Fish is the critical and the most primitive animal group in which the MHC-related genes could be found. We investigated MHC-related genes in the fish genome and also transcripts of those genes using RACE method. We also found some genes in the fish which can encode proteins with some MHC-related domains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：免疫、分子進化、生体防御、魚類、遺伝子、MHC、獲得免疫系、有顎脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

適応免疫系は、強力で効率的な生体防御系である。我々人類の生体防御も適応免疫系に依存しており、この生体防御系が破綻すると甚大な病変を引き起こすことが知られてい

る。抗体、T細胞レセプター、そして主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子が中心となる適応免疫系は、有顎脊椎動物に特徴的なシステムである。中でもMHC分子は反応全体の要を成す非常に重要な構成分子である。

その主要な機能はT細胞レセプターへの抗原ペプチドの提示であり、有効な免疫機能の発揮に不可欠な分子である。

MHC分子は、その機能発現に重要なリガンド結合ドメインと、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するC1セットドメインとから、主として構成されている。このリガンド結合ドメインは、配列及び構造的にユニークであり、独立したドメイングループとして分類されている。免疫グロブリンスーパーファミリーの起源の古さとは対照的に、リガンド結合ドメインは、有顎脊椎動物から突然出現する。これはタンパク質の分子進化の視点から大変興味深く、かつ非常に重要な問題である。

近年ゲノムプロジェクトにより動物系統樹上重要な位置を占める動物のゲノム情報が得られて来ている。本研究課題に関連する重要な成果として、脊椎動物の祖先に近縁の原索動物ホヤの全ゲノムが解明された。しかしながら、MHC分子を含む適応免疫系の主要構成分子をコードする遺伝子を見い出すことはできないことが報告された。また、最も原始的な脊椎動物である無顎類のリンパ球様細胞における発現遺伝子の網羅的な解析も報告された。しかし、この場合もMHC分子をコードする遺伝子は見い出されなかった。従って、現在、MHC分子の存在が明確な最も原始的な動物は、原始的有顎脊椎動物の軟骨魚類ということになる。近年、各種ゲノムプロジェクトが進み、様々な遺伝子の詳細な解析結果が報告されて来ているが、MHC分子をコードする遺伝子に関しては、その起源に関する情報は皆無であると言える。また哺乳類で見出される種々のMHC分子群構成分子の分子進化に関しても、魚類のレベルまで遡れるのはごく僅かである。

MHC分子が見出される最も原始的な動物グループである魚類におけるMHC遺伝子探索は世界的にも散発的であり、まだ大変不十分と考えられる。魚類における新しいMHC分子グループの存在に関する最近の解明(Dijkstra, J. M. et al. A third broad lineage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II-linkage and processed genes *Immunogenetics* 59, 305-321 (2007))は、この事実を裏付けており、MHC分子の分子進化を理解する為には、魚類MHC遺伝子群についての精力的な解明が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、研究がまだ非常に不十分であり、しかもMHC分子研究上動物系統発生的に鍵となる位置を占める魚類におけるMHC

分子の全体像の解明を目指し、MHC分子群の多様性の解明、それに基づきMHC分子の起源解明を目的とする。

3. 研究の方法

魚類MHC分子の遺伝子レベルでの網羅的単離解析を実施する。新規MHC遺伝子の解明を、実際の軟骨魚類及び硬骨魚類ゲノム等からの単離解析と、データベース解析を組み合わせて行なう。現在、既に解析対象としうるMHC遺伝子の部分情報を複数得ている。新規MHC遺伝子を明らかにし、発現解析、遺伝子構造解析を実施する。本研究で明らかになるMHC分子の配列情報に基づき、重要な系統発生的位置を占める動物である魚類のゲノムからMHC分子の起源に関わる配列情報を解明し、またMHC分子群における構成分子の分子進化を解明する。

4. 研究成果

MHC分子の分子進化に関して、重要な結果が得られている。

(1) 魚類MHC遺伝子配列の新規解明

ゲノムDNA及びcDNAより、遺伝子断片を実際に単離する方法と、データベース解析で候補遺伝子断片を得る方法の両者を実施した。実験による遺伝子単離方法は、基本的にPCR法を用いるが、使用するプライマーはdegenerated primersを設計して適宜用いた。基質は、軟骨魚類、硬骨魚類のDNA及びcDNAを用いた。データベース解析では、NCBI BLAST search等を用いて、条件設定を行ない、解析を実施した。Assemblyの状態のものとしては、*Takifugu rubripes* (torafugu)、*Tetraodon nigroviridis*、*Oryzias latipes* (Japanese medaka)が解析可能であり、利用した。また、In Progressの状態のものとしては、*Danio rerio* (zebra danio)、*Leucoraja erinacea* (little skate)等が利用可能である。以上の試みにより、いくつかの遺伝子候補断片を得ることができた。

(2) 魚類MHC分子の完全な遺伝子配列解析

得られたMHC遺伝子の部分配列を基に、遺伝子全体の配列の解析を進めた。種々の組織、細胞のmRNAを用いRT-PCRにより発現解析を行ない、発現が検出される場合には、さ

らに RACE 法を用いて、cDNA の全体配列を明らかにすることを実施した。データベース解析から遺伝子情報が得られる場合には、それらを利用して検討した。

(3) 魚類 MHC 分子配列比較解析

得られた遺伝子情報に基づき、既知の MHC 分子群構成メンバー等との配列比較解析を行なった。遺伝子産物のアミノ酸配列の alignment 解析を実施しているが、配列によっては、相当 alignment が難しい場合も見られる。系統樹解析をおこない、新規 MHC 分子の MHC 分子群中での分子進化的位置づけの解析が進行中である。

分子内ドメインが MHC 分子に関連していることが判明した分子について論文発表を行い、新規 MHC 関連分子については現在論文を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer U, Dijkstra JM. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Mol. Immunol.* in press (2011) 査読有り

Ohashi K, Takizawa F, Tokumaru N, Nakayasu C, Toda H, Fischer U, Moritomo T, Hashimoto K, Nakanishi T, Dijkstra JM. A molecule in teleost fish, related with human MHC-encoded G6F, has a cytoplasmic tail with ITAM and marks the surface of thrombocytes and in some fishes also of erythrocytes. *Immunogenetics* 62, 543-559 (2010) 査読有り

Hayashi N, Takeuchi M, Nakanishi T, Hashimoto K, Dijkstra JM. Zinc-dependent binding between peptides derived from rainbow trout CD8alpha and LCK. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 72-76 (2010) 査読有り

Ohtani M, Hayashi N, Hashimoto K, Nakanishi T, Dijkstra JM. *Comprehensive*

clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics* 60, 383-397 (2008) 査読有り

[学会発表](計5件)

Dijkstra JM et al. Thrombocytes and erythrocytes in teleost fish express a surface marker related to mammalian G6F with a cytoplasmic tail bearing an ITAM 第14回 国際免疫学会議 2010年8月23日 神戸

Dijkstra JM et al. MHC in salmonid fish and its linkage associations with disease resistance and social behavior 第9回 国際獣医免疫学シンポジウム 2010年8月17日 東京

Dijkstra JM, Hayashi N, Nakanishi T, Hashimoto K. Molecular characteristics of the leukocyte markers CD4-1, CD4-2, LAG-3, CD8alpha and CD8beta in teleost fish. 日本比較免疫学会 2009年8月4日 藤沢

Dijkstra JM, Ohtani M, Hayashi N, Nakanishi T, Hashimoto K. Evolution of cytokines important for T helper cell differentiation. 日本分子生物学会 2008年12月9日 神戸

Dijkstra JM, Hashimoto K. Unique features of major histocompatibility complex (MHC) genes in fish. 日本分子生物学会 2007年12月11日 横浜

[その他]
ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/ICMS/res03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本敬一郎 (HASHIMOTO KEIICHIRO)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授
研究者番号：70192268

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

J・M ダイクストラ (J・M
DIJKSTRA)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：10387681